·论著·

多发性骨髓瘤细胞通过 PI3K/AKT 信号通路促进 M2 巨噬细胞极化的机制研究

彭逸伦[1, 2]，李杨[1, 2]，王晓桃[1, 2, 3*]

【摘要】 背景 多发性骨髓瘤发病率长期居高不下，但目前关于磷脂酰肌醇 -3- 激酶（PI3K）/ 丝氨酸 / 苏氨酸激酶（AKT）信号通路和 M2 巨噬细胞极化促进多发性骨髓瘤发生进展的研究较少。**目的** 探讨 M2 巨噬细胞在多发性骨髓瘤患者中的表达及 PI3K/AKT 信号通路促进 M2 巨噬细胞极化的机制研究。**方法** 选取 2021 年 10 月—2022 年 4 月于桂林医学院附属医院血液内科确诊的多发性骨髓瘤患者 48 例为试验组，选取同期健康志愿者（血液内科骨髓移植健康供者）30 名为对照组。取 2 组研究对象外周血并分离单个核细胞，流式细胞术检测 M2 巨噬细胞比例。采用细胞传代培养 RPMI8226 细胞，通过佛波酯分化培养单核巨噬细胞 THP-1 为巨噬细胞。根据实验需要将瘤细胞培养并采用 siRNA 转染沉默磷酸酶基因（PTEN）分成 3 组：空白组、siRNA-PTEN 实验组、siRNA 对照组；收集以上 3 组细胞培养基上清液加入巨噬细胞共培养体系后分为 4 组：M0 巨噬细胞组、瘤细胞上清液组、siRNA-PTEN 上清液组、siRNA 上清液组。采用 Western Blot 实验检测多发性骨髓瘤细胞培养的空白组、siRNA-PTEN 实验组、siRNA 对照组的 AKT、p-AKT、PI3K-p85、p-PI3K-p85 蛋白表达水平。采用荧光定量聚合酶链式反应（PCR）检测多发性骨髓瘤细胞培养的空白组、siRNA-PTEN 实验组、siRNA 对照组的 MMP2、MMP9 的 mRNA 表达水平。采用流式细胞术检测多发性骨髓瘤上清液共培养的 M0 巨噬细胞组、瘤细胞上清液组、siRNA-PTEN 上清液组、siRNA 上清液组 M2 巨噬细胞中特异性抗体 CD163、CD206、F4/80 表达水平。采用荧光定量 PCR 检测多发性骨髓瘤上清液共培养的 M0 巨噬细胞组、瘤细胞上清液组、siRNA-PTEN 上清液组、siRNA 上清液组 M2 巨噬细胞特异标志物精氨酸酶 1（ARG-1）、白介素 10（IL-10）的 mRNA 表达水平。**结果** 试验组 M2 巨噬细胞表达水平高于对照组（t=0.855，P<0.001）。Western Blot 结果显示，3 组多发性骨髓瘤细胞 p-AKT/AKT、p-PI3K-p85/PI3K-p85 蛋白表达水平比较，差异有统计学意义（F=11.795，P=0.008；F=24.579，P<0.001）；其中 siRNA-PTEN 实验组中 p-AKT/AKT、p-PI3K-p85/PI3K-p85 蛋白表达水平均高于空白组和 siRNA 对照组（P<0.05）。荧光定量 PCR 结果显示，3 组多发性骨髓瘤细胞 MMP2、MMP9 的 mRNA 表达水平比较，差异有统计学意义（F=63.777，P<0.001；F=31.007，P<0.001）；其中 siRNA-PTEN 实验组中 MMP2、MMP9 的 mRNA 表达水平均高于空白组和 siRNA 对照组（P<0.05）。流式细胞术结果显示，4 组 M2 巨噬细胞特异性抗体 CD163+F4/80、CD206+F4/80 表达水平比较，差异有统计学意义（F=384.218，P<0.001；F=299.663，P<0.001）；其中 siRNA-PTEN 上清液组 M2 巨噬细胞特异性抗体 CD163+F4/80、CD206+F4/80 表达水平高于瘤细胞上清液组和 siRNA 上清液组（P<0.05）。荧光定量 PCR 结果显示，4 组 M2 巨噬细胞特异标志物 ARG-1、IL-10 的 mRNA 表达水平比较，差异有统计学意义（F=19.826，P<0.001；F=34.507，P<0.001）；其中 siRNA-PTEN 上清液组 M2 巨噬细胞特异标志物 ARG-1、IL-10 的 mRNA 表达水平高于瘤细胞上清液组和 siRNA 上清液组（P<0.05）。**结论** 多发性骨髓瘤患者中 M2 巨噬细胞表达上调，多发性骨髓瘤细胞可通过激活 PI3K/AKT 信号通路促进 M2 巨噬细胞极化，调控骨髓瘤细胞微环境。

【关键词】 多发性骨髓瘤；巨噬细胞；信号传导；肿瘤微环境；生物标记，肿瘤；细胞极化；发病机制

【中图分类号】 R 733.3 **【文献标识码】** A DOI：10.12114/j.issn.1007-9572.2023.0322

【引用本文】 彭逸伦，李杨，王晓桃 . 多发性骨髓瘤细胞通过 PI3K/AKT 信号通路促进 M2 巨噬细胞极化的机制研究［J］. 中国全科医学，2023. DOI：10.12114/j.issn.1007-9572.2023.0322.［Epub ahead of print］.［www.chinagp.net］

PENG Y L，LI Y，WANG X T. Study on the mechanisms of multiple myeloma cells promoting M2 macrophage polarization through PI3K/AKT signaling pathway［J］. Chinese General Practice，2023.［Epub ahead of print］.

基金项目：国家自然科学基金资助项目（82060044）；广西自然科学基金资助项目（2020aXNSFAA1590）；国家级大学生创新创业训练计划（202010601010）

1.541004 广西壮族自治区桂林市，桂林医学院临床医学院 2.541004 广西壮族自治区桂林市，桂林医学院附属医院临床试验中心 3.541004 广西壮族自治区桂林市，桂林医学院附属医院血液内科

*通信作者：王晓桃，主任医师；E-mail：535163312@qq.com

本文数字出版日期：2023-07-14

Study on the Mechanisms of Multiple Myeloma Cells Promoting M2 Macrophage Polarization through PI3K/AKT Signaling Pathway *PENG Yilun*[1, 2], *LI Yang*[1, 2], *WANG Xiaotao*[1, 2, 3*]

1.Clinical medical school, Medical Colleges of Guilin, Guilin 541104, China

2.Clinical Trials Center, Medical Colleges of Guilin, Guilin 541104, China

3.Department of Hematopathology, Medical Colleges of Guilin, Guilin 541104, China

Corresponding author: WANG Xiaotao, Chief physician; E-mail: 535163312@qq.com

【Abstract】 **Background** The incidence of multiple myeloma has long been high, however, there are fewer studies on phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) /serine-threonine kinase (AKT) signaling pathway and M2 macrophage polarization promoting the progression of multiple myeloma. **Objective** To investigate the expression of M2 macrophages in patients with multiple myeloma and the mechanism of PI3K/AKT signaling pathway promoting M2 macrophage polarization. **Methods** Forty-eight multiple myeloma patients diagnosed in the Department of Hematology of the Affiliated Hospital of Guilin Medical University from October 2021 to April 2022 were selected as the test group, and thirty healthy volunteers (healthy donors of blood marrow transplantation) in the same period were selected as the control group. Peripheral blood was taken from the 2 group and mononuclear cells were isolated, the proportion of M2 macrophages was determined by flow cytometry. RPMI8226 cells were subcultured by cell passage, and mononuclear macrophages THP-1 cells were cultured as macrophages by phorbol ester differentiation. According to the experimental requirements, tumor cells were cultured and transfected with siRNA to silence phosphatase and tensin homolog (PTEN) and divided into three groups, including blank group, siRNA-PTEN experimental group, and siRNA control group; the supernatants of the above three groups were collected and added to the macrophage co-culture system and then divided into four groups including M0 macrophage group, tumor cell supernatant group, siRNA-PTEN supernatant group, and siRNA supernatant group. The protein expression levels of AKT, p-AKT, PI3K-p85, and p-PI3K-p85 in the blank group, siRNA-PTEN experimental group, and siRNA control group of multiple myeloma cell culture were determined by Western Blot assay. The mRNA expression levels of MMP2 and MMP9 in the blank group, siRNA-PTEN experimental group and siRNA control group were determined by fluorescence quantitative polymerase chain reaction (PCR). The expression levels of specific antibodies CD163, CD206, and F4/80 in M2 macrophages in M0 macrophage group, tumor cell supernatant group, siRNA-PTEN supernatant group, and siRNA supernatant group were determined by flow cytometry. The mRNA expression levels of arginase 1 (ARG-1) and interleukin 10 (IL-10) in M0 macrophage group, tumor cell supernatant group, siRNA-PTEN supernatant group, and siRNA supernatant group were determined by fluorescence quantitative PCR. **Results** The expression level of M2 macrophages was higher in the test group than that in the control group (t=0.855, P<0.001). Western Blot results showed that there were significant differences in the protein expression levels of p-AKT/AKT and p-PI3K-p85/PI3K-p85 among the three groups (F=11.795, P=0.008; F=24.579, P<0.001); the protein expression levels of p-AKT/AKT and p-PI3K-p85/PI3K-p85 in the siRNA-PTEN experimental group were higher than the blank group and siRNA control group (P<0.05). The results of quantitative fluorescence PCR showed that there were significant differences in the mRNA expression levels of MMP2 and MMP9 in the three groups of multiple myeloma cells (F=63.777, P<0.001; F=31.007, P<0.001); the mRNA expression levels of MMP2 and MMP9 in the siRNA-PTEN experimental group were higher than the blank group and siRNA control group (P<0.05). Flow cytometry results showed that there were statistically significant differences in the expression levels of M2 macrophage-specific antibodies CD163+F4/80 and CD206+F4/80 among the four groups (F=384.2818, P<0.001; F=299.663, P<0.001); M2 macrophage specific antibody CD163+F4/80 and CD206+F4/80 in the siRNA-PTEN supernatant group were higher than the tumor cell supernatant and siRNA-PTEN supernatant group (P<0.05). The quantitative PCR showed that there were statistically significant differences in the mRNA expression levels of M2 macrophage-specific markers ARG-1 and IL-10 among the four groups (F=19.826, P<0.001; F=34.507, P<0.001); the mRNA expression levels of ARG-1 and IL-10 in the siRNA-PTEN supernatant group were higher than the tumor cell supernatant group and siRNA supernatant group (P<0.05). **Conclusion** M2 macrophages are upregulated in multiple myeloma patients, and multiple myeloma cells can promote M2 macrophage polarization through activation of the PI3K/AKT signaling pathway, thereby regulating the myeloma cell microenvironment.

【Key words】 Multiple myeloma; Macrophages; Signal transduction; Tumor microenvironment; Biomarkers, tumor; Cell polarization; Pathogenesis

多发性骨髓瘤是终末分化的B淋巴细胞恶性肿瘤，是第二常见的血液系统恶性肿瘤[1]。由于瘤细胞本身的异质性、克隆的演变等导致复发而进展、治疗失败，其根源在于骨髓微环境机制尚未明确[2]。因此迫切需要探索多发性骨髓瘤发病相关因素及机制，从而采取有效的预防策略，降低多发性骨髓瘤发病率。

肿瘤微环境（tumor microenvironment，TME）介导肿瘤相关巨噬细胞最近已成为研究者们关注的焦点，TME对瘤细胞的发生、发展、转移、耐药和复发都有重要的作用[3]。巨噬细胞是炎性细胞之一，是参与固有免疫的重要细胞，其表型和功能与多发性骨髓瘤微环境相关，根据不同的骨髓微环境（bone marrow microenvironment，BMME）信号而表现出极高的可塑性和多功能性，一般认为有两种：M1型，即经典活化的巨噬细胞，具有白介素（interleukin，IL）12高/IL-10低的表型，可产生IL-1β、IL-6、肿瘤坏死因子α（tumor necrosis factor-α，TNF-a）等，具有明显促炎和抗肿瘤活性；M2型，即替代活化的巨噬细胞，在肿瘤患者中称肿瘤相关巨噬细胞（tumor-associatedmacrophages，TAMs），具有IL-12低/IL-10高的表型，表达CD163、CD204和CD206，产生IL-10、IL-13等抗炎因子，具有抑制肿瘤免疫、促进肿瘤发展的作用[4]。TME中，基质金属蛋白酶2（matrix metalloproteinase 2，MMP2）和基质金属蛋白酶9（matrix metalloproteinase 9，MMP9）作为肿瘤的生物标志物具有重要功能，可作为肿瘤预测指标、复发指标及预后判断等，并对血液肿瘤的生长、侵袭和转移具有重要意义[5]。

磷脂酰肌醇-3-激酶（PI3K）/丝氨酸/苏氨酸激酶（AKT）通路的异常激活在肿瘤细胞的增殖、迁移、侵袭和凋亡等生物学行为中起着关键作用[6]。急性白血病、慢性白血病、各种类型的淋巴瘤和多发性骨髓瘤中经常发现PI3K/AKT通路激活及其下游效应。PI3K/AKT通路激活甚至发生在肿瘤早期阶段，并与多种人类癌症不良预后和治疗耐药相关[7]。当磷酸酶基因（phosphatase and tensin homolog，PTEN）缺失时，PI3K/AKT通路可能会被激活，这种激活可能会导致癌症的发生和发展。在多发性骨髓瘤患者中，推测骨髓瘤细胞通过激活PI3k/AKT信号通路促进巨噬细胞征集到骨髓微环境里向M2极性转变，从而刺激瘤细胞增殖，导致骨髓瘤的发生、发展，复发难治，并进行验证。

本研究选取多发性骨髓瘤患者为研究对象，探讨M2巨噬细胞在多发性骨髓瘤患者中的表达及PI3K/AKT信号通路促进M2巨噬细胞极化的机制，以明确多发性骨髓瘤的发生、发展机制，为临床多发性骨髓瘤疾病的靶向治疗提供参考。

1 资料与方法

1.1 研究对象 选取2021年10月—2022年4月于桂林医学院附属医院血液内科确诊的多发性骨髓瘤患者48例为试验组，选取同期健康志愿者（血液内科骨髓移植健康供者）30名为对照组。本研究已通过桂林医学院附属医院伦理委员会伦理审查（编号：2021YJSLL-86），研究对象均知情同意并签署知情同意书。

1.1.1 患者纳入标准 （1）根据国际骨髓瘤工作组更新的多发性骨髓瘤诊断标准诊断为多发性骨髓瘤[8-9]；（2）年龄≥18岁。

1.1.2 患者排除标准 继发性（之前诊断为其他恶性肿瘤的患者）或混合性（同时诊断为多发性骨髓瘤和其他恶性肿瘤的患者）多发性骨髓瘤；（2）合并风湿系统的自身免疫性疾病或其他肿瘤性疾病；（3）合并其他造血系统疾病、淋巴组织疾病或实体肿瘤病史；（4）孕妇或哺乳期妇女。

1.2 资料收集 收集多发性骨髓瘤患者及健康志愿者的相关临床特征资料，包括年龄、性别、免疫球蛋白分型、Durie-Salmon分期、ISS分期、骨质损害程度等。

1.3 实验方法及分组

1.3.1 标本处理、细胞培养与转染 采集研究对象空腹外周静脉血，提取单个核细胞，-80 ℃冻存。人多发性骨髓瘤细胞系RPMI8226和THP-1（均由桂林医学院附属医院临床试验中心提供）进行传代培养。采用佛波酯分化培养THP-1细胞为巨噬细胞。RPMI8226细胞培养并用siRNA干扰沉默PTEN处理分成3组：空白组、siRNA-PTEN实验组和siRNA对照组。

1.3.2 蛋白免疫印迹 RPMI8226细胞系采用AKT（艾菲公司）、p-AKT（艾菲公司）、PI3K-p85（艾菲公司）、p-PI3K-p85（艾菲公司）的一抗进行免疫印迹检测。以β-actin（艾菲公司）作为内对照，采用Western Blot检测空白组、siRNA-PTEN实验组、siRNA对照组3组的AKT、p-AKT、PI3K-p85、p-PI3K-p85蛋白表达水平。

1.3.3 荧光定量聚合酶链式反应（PCR） 为了证明PI3K/AKT信号通道的激活可以提高多发性骨髓瘤细胞的生长和侵染水平，将空白组、siRNA-PTEN实验组和siRNA对照组的瘤细胞进行荧光定量PCR实验。设计引物（表1），提取RPMI8226细胞THP-1诱导分化巨噬细胞的RNA，进行逆转录，扩增反应条件为：首先在93 ℃下预变性，93 ℃ 7 min，55 ℃ 1 min，72 ℃ 1 min，共经过40次循环，72 ℃ 7 min。检测瘤细胞MMP2、MMP9的mRNA，检测共培养体系中THP-1诱导分化巨噬细胞的M2型巨噬细胞的标志物精氨酸酶1（arginase 1，ARG-1）和白介素10（interleukin 10，IL-10）的mRNA。

1.3.4 流式细胞术 收集空白组、siRNA-PTEN实验组、

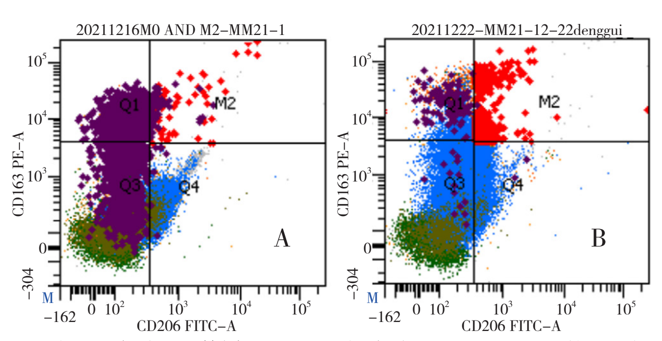
siRNA 对照组 3 组细胞培养基上清液加入巨噬细胞共培养体系后分为 4 组：M0 巨噬细胞组、瘤细胞上清液组、siRNA-PTEN 上清液组、siRNA 上清液组。采用流式细胞术，检测多发性骨髓瘤上清液共培养的 M2 巨噬细胞和提取的单个核细胞中特异性抗体 CD163、CD206、F4/80 表达水平。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 26.0 统计学软件进行数据分析。符合正态分布的计量资料以（$\bar{x} \pm s$）表示，两组间比较采用 t 检验，多组间比较采用单因素方差分析；不符合正态分布的计量资料以 M（P_{25}，P_{75}）表示，组间比较采用秩和检验；计数资料以相对数表示。以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 研究对象基本临床资料 试验组 48 例多发性骨髓瘤患者年龄为65.5(56.8,75.0)岁，其中男 25 例(52.1%)、女 23 例(47.9%)；免疫球蛋白分型：IgA 14 例(29.2%)，IgG 25 例(52.1%)，IgD 3 例(6.3%)，其他 6 例(12.5%)；Durie-Salmon 分期：Ⅰ期患者 5 例（10.4%），Ⅱ期患者 7 例（14.6%），Ⅲ期患者 36 例（75.0%）；ISS 分期：Ⅰ期患者 9 例（18.8%），Ⅱ期患者 13 例（27.1%），Ⅲ期患者 26 例（54.2%）；骨损害 36 例（75.0%），合并骨质破坏 25 例（52.1%）。对照组 30 例健康志愿者年龄为 58.0（52.0，70.0）岁，其中男 12 例（40.0%）、女 18 例（60.0%）；异常单克隆免疫球蛋白（M 蛋白）1 例（3.3%）。

2.2 研究对象外周血 M2 巨噬细胞表达水平 经过流式细胞术检测，试验组中 CD163、CD206 标记的 M2 巨噬细胞表达水平为（1.763 ± 0.316），对照组中 CD163、CD206 标记的 M2 巨噬细胞的表达水平为（0.675 ± 0.244），试验组 M2 巨噬细胞表达水平高于对照组，差异有统计学意义（t=0.855，P<0.001），见图 1。



注：A 为对照组外周血 M2 巨噬细胞（CD163 和 CD206 的巨噬细胞）表达水平的流式细胞图；B 为试验组外周血 M2 巨噬细胞（CD163 和 CD206 的巨噬细胞）表达水平的流式细胞图。

图 1 研究对象外周血 M2 巨噬细胞表达水平

Figure 1 Expression levels of M2 macrophages in peripheral blood

2.3 siRNA 转染多发性骨髓瘤细胞后 PTEN mRNA 表达水平 采用 siRNA 转染 RPMI8226 细胞（图 2），并用荧光定量 PCR 检测转染效果。经荧光定量 PCR 分析，多发性骨髓瘤细胞培养的空白组 PTEN mRNA 表达水平为（1.035 ± 0.039），siRNA-PTEN 实验组 PTEN mRNA 表达水平为（0.240 ± 0.059），siRNA 对照组 PTEN mRNA 表达水平为（1.091 ± 0.083），3 组 PTEN mRNA 表达水平比较，差异有统计学意义（F=171.861，P<0.001）；其中 siRNA-PTEN 实验组 PTEN mRNA 表达水平低于空白组和 siRNA 对照组，差异有统计学意义（P<0.05）。

2.4 多发性骨髓瘤细胞 PI3K/AKT 蛋白表达水平 为了验证多发性骨髓瘤中 PI3K/AKT 通路的激活情况，采用 Western Blot 实验检测多发性骨髓瘤细胞培养的空白组、siRNA-PTEN 实验组、siRNA 对照组 3 组的 AKT、p-AKT、PI3K-p85、p-PI3K-p85 蛋白表达水平，见图 3。

表 1 实时定量 PCR 使用引物列表

Table 1 List of primers used for real-time quantitative PCR

基因名称	NCBIGeenID	基因编号	序列	产物长度（bp）
ARG-1	383	NM_000045	TGGACAGACtAGGAATTGGCA	102
			CCAGTCCGTCAACATCAAAACt	
IL-10	3586	NM_000572	GACTTTAAGGGTTACCTGGGTTG	112
			TCACATGCGCCTTGATGTCTG	
MMP2	4313	NM_004530	GATACCCCTTTGACGGTAAGGA	112
			CCTTCTCCCAAGGTCCATAGC	
MMP9	4318	NM_004994	GGGACGCAGACATCGTCATC	139
			TCGTCATCGTCGAAATGGGC	
PTEN	5728	NM_000314	TTTGAAGACCATAACCCACCAC	134
β-actin	60	NM_001101	CATGTACGTTGCTATCCAGGC	250
			CTCCTTAATGTCACGCACGAT	

注：PCR= 聚合酶链式反应，ARG-1= 精氨酸酶 1，IL-10= 白介素 10，MMP2= 基质金属蛋白酶 2，MMP9= 基质金属蛋白酶 9，PTEN= 磷酸酶基因，NCBIGeenID= 美国国家生物技术信息中心基因身份证。

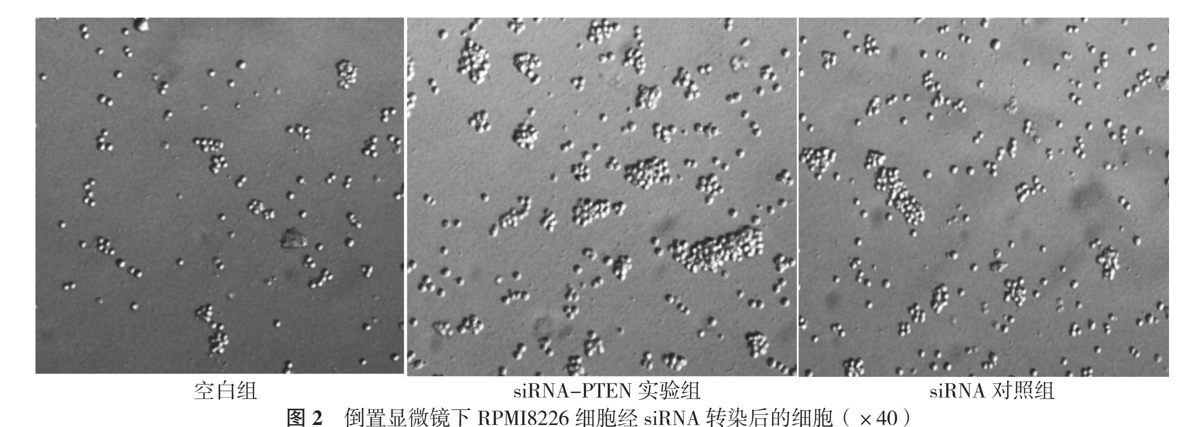
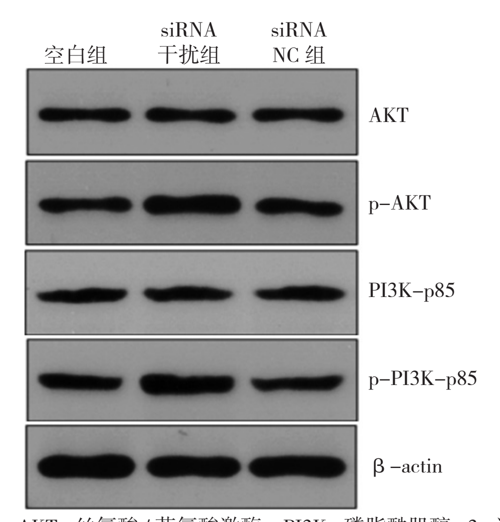


图 2 倒置显微镜下 RPMI8226 细胞经 siRNA 转染后的细胞（×40）

Figure 2 The cellular level of RPMI8226 cells transfected with siRNA under inverted microscope



注：AKT= 丝氨酸 / 苏氨酸激酶，PI3K= 磷脂酰肌醇 -3- 激酶。

图 3 多发性骨髓瘤细胞 PI3K/AKT 蛋白表达图

Figure 3 Protein expression map of PI3K/AKTin multiple myeloma cells

3 组多发性骨髓瘤细胞 p-AKT/AKT 蛋白表达水平比较，差异有统计学意义（F=11.795，P=0.008）；其中 siRNA-PTEN 实验组中 p-AKT/AKT 蛋白表达水平高于空白组和 siRNA 对照组，差异有统计学意义（P<0.05）。3 组多发性骨髓瘤细胞 p-PI3K-p85/PI3K-p85 蛋白表达水平比较，差异有统计学意义（F=24.579，P<0.001）；其中 siRNA-PTEN 实验组中 p-PI3K-p85/PI3K-p85 蛋白表达水平高于空白组和 siRNA 对照组，差异有统计学意义（P<0.05），见表 2。

2.5 多发性骨髓瘤细胞 MMP2、MMP9 的 mRNA 表达水平 3 组多发性骨髓瘤细胞 MMP2 的 mRNA 表达水平比较，差异有统计学意义（F=63.777，P<0.001）；其中 siRNA-PTEN 实验组中 MMP2 的 mRNA 表达水平高于空白组和 siRNA 对照组，差异有统计学意义（P<0.05）。3 组多发性骨髓瘤细胞 MMP9 的 mRNA 表达水平比较，差异有统计学意义（F=31.007，P<0.001）；其中 siRNA-PTEN 实验组中 MMP9 的 mRNA 表达水平高于空白组和 siRNA 对照组，差异有统计学意义（P<0.05），见表 3。

表 2 多发性骨髓瘤细胞中 PI3K/AKT 蛋白表达水平

Table 2 Protein expression level of PI3K/AKT in multiple myeloma cells

组别	p-AKT/AKT	p-PI3K-p85/PI3K-p85
空白组	1.070 ± 0.070	0.843 ± 0.287
siRNA-PTEN 实验组	2.051 ± 0.297[a]	1.801 ± 0.111[a]
siRNA 对照组	1.229 ± 0.344[b]	0.950 ± 0.079[b]
F 值	11.795	24.579
P 值	0.008	P<0.001

注：AKT= 丝氨酸 / 苏氨酸激酶，PI3K= 磷脂酰肌醇 -3- 激酶；[a] 表示与空白组比较 P<0.05，[b] 表示与 siRNA-PTEN 实验组比较 P<0.05。

表 3 多发性骨髓瘤细胞 MMP2、MMP9 的 mRNA 表达水平

Table 3 The mRNA expression levels of MMP2 and MMP9 in multiple myeloma cells

组别	MMP2 mRNA	MMP9 mRNA
空白组	0.979 ± 0.041	1.087 ± 0.101
siRNA-PTEN 实验组	2.089 ± 0.155[a]	2.670 ± 0.439[a]
siRNA 对照组	1.149 ± 0.157[b]	1.176 ± 0.163[b]
F 值	63.777	31.007
P 值	P<0.001	P<0.001

注：[a] 表示与空白组比较 P<0.05，[b] 表示与 siRNA-PTEN 实验组比较 P<0.05。

2.6 THP-1 诱导分化巨噬细胞中 M2 巨噬细胞特异性抗体 CD163、CD206、F4/80 表达水平 经流式细胞术检测，4 组 M2 巨噬细胞特异性抗体 CD163+F4/80 表达水平比较，差异有统计学意义（F=384.218，P<0.001）；其中与 M0 巨噬细胞组相比，瘤细胞上清液组、siRNA-PTEN 上清液组和 siRNA 上清液组 M2 巨噬细胞特异性抗体 CD163+F4/80 表达水平均升高；且 siRNA-PTEN 上清液组 M2 巨噬细胞特异性抗体 CD163+F4/80 表达水平高于瘤细胞上清液组和 siRNA 上清液组，差异有统计学意义（P<0.05）。4 组 M2 巨噬细胞特异性

抗体 CD206+F4/80 表达水平比较，差异有统计学意义（F=299.663，P<0.001）；其中与 M0 巨噬细胞组相比，瘤细胞上清液组、siRNA-PTEN 上清液组和 siRNA 上清液组 M2 巨噬细胞特异性抗体 CD206+F4/80 表达水平均升高；且 siRNA-PTEN 上清液组 M2 巨噬细胞特异性抗体标记物 CD206+F4/80 表达水平高于瘤细胞上清液组和 siRNA 上清液组，差异有统计学意义（P<0.05），见图 4、表 4。

表 4 THP-1 诱导分化巨噬细胞中 M2 巨噬细胞特异性抗体 CD163、CD206、F4/80 表达水平

Table 4 The expression levels of M2 macrophage-specific antibodies CD163，CD206，and F4/80 induced by THP-1 in differentiated macrophages

组别	CD163+F4/80	CD206+F4/80
M0 巨噬细胞组	2.900 ± 0.656	5.567 ± 1.332
瘤细胞上清液组	21.667 ± 0.874[a]	11.033 ± 1.498[a]
siRNA-PTEN 上清液组	46.067 ± 1.872[ab]	40.200 ± 1.493[ab]
siRNA 上清液组	22.300 ± 2.252[ac]	12.267 ± 1.858[ac]
F 值	384.218	299.663
P 值	P<0.001	P<0.001

注：[a] 表示与 M0 巨噬细胞组比较 P<0.05，[b] 表示与瘤细胞上清液组比较 P<0.05，[c] 表示与 siRNA-PTEN 上清液组比较 P<0.05。

2.7 THP-1 诱导分化巨噬细胞中 M2 巨噬细胞特异标志物 ARG-1、IL-10 的 mRNA 表达水平 通过荧光定量 PCR 检测，

4 组 M2 巨噬细胞特异标志物 ARG-1 的 mRNA 表达水平比较，差异有统计学意义（F=19.826，P<0.001）；其中与 M0 巨噬细胞组相比，瘤细胞上清液组、siRNA-PTEN 上清液组和 siRNA 上清液组 M2 巨噬细胞特异标志物 ARG-1 的 mRNA 表达水平均升高；且 siRNA-PTEN 上清液组 M2 巨噬细胞特异标志物 ARG-1 的 mRNA 表达水平高于瘤细胞上清液组和 siRNA 上清液组，差异有统计学意义（P<0.05）。4 组 M2 巨噬细胞特异标志物 IL-10 的 mRNA 表达水平比较，差异有统计学意义（F=34.507，P<0.001）；其中与 M0 巨噬细胞组相比，瘤细胞上清液组、siRNA-PTEN 上清液组和 siRNA 上清液组 M2 巨噬细胞特异标志物 IL-10 的 mRNA 表达水平均升高；且 siRNA-PTEN 上清液组 M2 巨噬细胞特异标志物 IL-10 的 mRNA 表达水平高于瘤细胞上清液组和 siRNA 上清液组，差异有统计学意义（P<0.05），见表 5。

表 5 THP-1 诱导分化巨噬细胞中 M2 巨噬细胞特异标志物 ARG-1、IL-10 的 mRNA 表达水平

Table 5 The expression levels of M2 macrophage-specific markers ARG-1 and IL-10 induced by THP-1 in differentiated macrophages

组别	ARG-1 mRNA	IL-10 mRNA
M0 巨噬细胞组	0.965 ± 0.094	1.015 ± 0.099
瘤细胞上清液组	2.208 ± 0.379[a]	1.722 ± 0.171[a]
siRNA-PTEN 上清液组	4.712 ± 1.122[ab]	3.653 ± 0.601[ab]
siRNA 上清液组	2.173 ± 0.298[ac]	1.839 ± 0.199[ac]
F 值	19.826	34.507
P 值	P<0.001	P<0.001

注：[a] 表示与 M0 巨噬细胞组比较 P<0.05，[b] 表示与瘤细胞上清液组比较 P<0.05，[c] 表示与 siRNA-PTEN 上清液组比较 P<0.05。

3 讨论

多发性骨髓瘤是一种终末分化的 B 淋巴细胞恶性

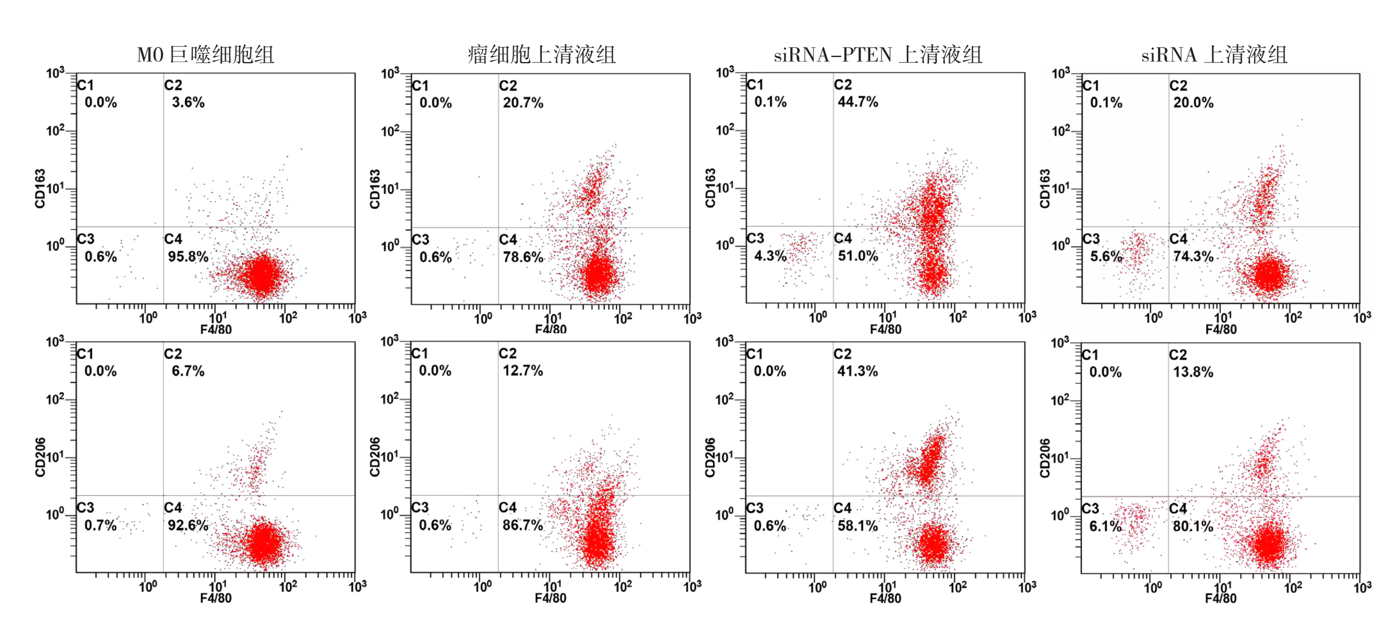


图 4 THP-1 诱导分化巨噬细胞中 M2 巨噬细胞特异性抗体 CD163、CD206、F4/80 表达水平

Figure 4 The expression levels of M2 macrophage-specific antibodies CD163，CD206，and F4/80 induced by THP-1 in differentiated macrophages

肿瘤。骨髓微环境中，浆细胞的异常克隆增殖可能源于无症状前体疾病，如意义未明的单克隆丙种球蛋白病（monoclonal gammopathy of undetermined significance，MGUS）或冒烟型骨髓瘤（smoldering multiple myeloma，SMM）[10]。这种疾病的主要症状包括高钙血症、骨疾病、肾功能不全和贫血等。疾病进展和随后的复发以亚克隆进化和耐药为特征，几乎所有患者最终均会发展为复发和难治类型，其进展受到 TME 影响显著[11]。因此，研究多发性骨髓瘤微环境中免疫细胞在疾病发生、进展中的机制，并转化为临床治疗作用具有重要意义。

本研究选取多发性骨髓瘤患者的外周血单个核细胞进行流式细胞术实验，结果显示，M2 巨噬细胞表达水平在多发性骨髓瘤患者中相比健康志愿者上调（P<0.001），与许多国内外研究相一致[12-13]。在许多癌症中，肿瘤细胞会分泌 M2 样细胞因子，如 IL-10、CCL2/3/4/5/7/8、基质细胞衍生因子 -1（SDF-1）、血管内皮生长因子（VEGF）和血小板细胞衍生生长因子（PDGF），这些因子可以吸引更多的单核细胞和 M0 巨噬细胞，并将其转化为 M2 表型。大多数肿瘤内巨噬细胞表现出 M2 表型，并与一些恶性肿瘤的不良预后相关[14]。在 TME 中，TAMs 最常出现在 M2 样的肿瘤前表型中[14]。有研究表明，多发性骨髓瘤患者中 TAMs 明显增多，提示患者具有不良预后[15]。TAMs 的极化过程可能由骨髓瘤微环境内的瘤细胞调控，其表型比例随多发性骨髓瘤进展而发生变化。研究发现在肿瘤发展的早期阶段，皮肤中 M1 TAMs 在黑色素瘤中转移为 M2 表型，M2 巨噬细胞的存在与不良预后相关[16-17]。有文献发现在多发性骨髓瘤患者体内 TAMs 增强与多发性骨髓瘤进展有关[18]。本研究发现在多发性骨髓瘤患者体内存在 M2 巨噬细胞高表达。因此，需要进一步探讨多发性骨髓瘤细胞中导致 M2 巨噬细胞极化并促进骨髓瘤进展的机制。

回顾既往关于肿瘤相关巨噬细胞和瘤细胞迁移、侵袭、增殖的相关研究，TAMs 对肿瘤细胞几乎没有细胞毒性，并促进了肿瘤细胞增殖[19-20]。在 TME 中，TAMs 和肿瘤细胞通过分泌细胞因子促进肿瘤细胞增殖。体外研究证实，结肠癌细胞通过分泌转化生长因子 β1（TGF-β1）上调巨噬细胞中补体应答基因 32（RGC-32）的表达，RGC-32 促进巨噬细胞的迁移，进一步加速结肠癌细胞的增殖[19]。通过体外共培养 TAMs 和 CT26 结肠癌细胞，发现 TAMs 调控的氧化应激可以影响结肠癌细胞的增殖，并且癌症的侵袭和转移是导致 90% 以上患者死亡的主要原因[22-23]。许多研究表明，TAMs 的促肿瘤作用可以诱导结肠癌细胞的生长和转移。通过 MAPK 活化蛋白激酶 2（MK2），TAMs 可以分泌单核细胞趋化蛋白 MCP1 和巨噬细胞炎症蛋白 1α 和 2α，这些蛋白质可以诱导体外恶性肿瘤细胞的生长和入侵，并且促使癌症的发展和转化[24]。通过调节烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸（NADPH）氧化酶的活性，TAMs 可以有效地抑制活性氧（ROS）的产生，进而维持 TME 的氧化还原平衡，进而有效地促使肿瘤细胞生长[25]。

因此，本研究就多发性骨髓瘤中 PI3K/AKT 通路活化能否导致瘤细胞增殖和侵袭能力增强进行了验证。MMP2 和 MMP9 作为肿瘤生物标志物有重要功能，可作为肿瘤预测指标，对血液肿瘤的生长、侵袭和转移具有重要意义，MMP2 和 MMP9 高表达提示肿瘤侵袭转移能力增强，疾病进展。本研究采用荧光定量 PCR 检测肿瘤标志物 MMP2、MMP9 的 mRNA 表达水平，在 siRNA-PTEN 实验组表达水平中相对空白组和 siRNA 对照组上调（P<0.001），表明 PI3K/AKT 通路激活促进瘤细胞增殖和侵袭能力增强。

结合本课题组的前期研究结果和国内外研究，本研究发现多发性骨髓瘤中 M2 巨噬细胞极化与 PI3K/AKT 通路的活化相关[26-27]，并进行验证。采用荧光定量 PCR 检测，siRNA-PTEN 上清液组通路激活后 M2 巨噬细胞特异性抗体 CD163+F4/80 和 CD206+F4/80 表达水平相对瘤细胞上清液组和 siRNA 上清液组均上调（P<0.05）；采用流式细胞术检测 M2 巨噬细胞特异标志物 ARG-1、IL-10 的 mRNA 表达水平，在 siRNA-PTEN 上清液组中表达水平相对相对瘤细胞上清液组和 siRNA 上清液组均上调（P<0.001）；表明多发性骨髓瘤细胞中 PI3K/AKT 通路激活促进 M2 巨噬细胞极化。

综上所述，本研究进一步证实了多发性骨髓瘤患者体内 M2 巨噬细胞增多，在多发性骨髓瘤细胞中可能是通过激活 PI3K/AKT 通路促进 M2 巨噬细胞极化。本课题的从细胞、到病人标本等多方面实验设计并挖掘多发性骨髓瘤中巨噬细胞向 M2 型巨噬细胞极性改变调控的关系，甄别出关键调控靶点并探索作用机制。近几年国内外学者的研究侧重放在 M2 型肿瘤相关巨噬细胞在多种实体瘤中的发生、发展中的作用，而关于 M2 型肿瘤相关巨噬细胞在多发性骨髓瘤中作用仅限于对多发性骨髓瘤的发生、发展、预后及耐药等报道，鲜有报道在 MM 骨髓微环境中的来源及机制。本研究实验设计具有系统性创新特色，明确了 PI3K/AKT 信号通路在 MM 骨髓微环境中参与 CD163、CD206 阳性的 M2 型巨噬细胞极性改变的发生和发展，对临床中对多发性骨髓瘤疾病的靶向治疗有指导意义。

作者贡献：王晓桃提出研究思路，设计研究方案，负责论文起草、最终版本的修订，对论文负责。彭逸伦进行研究过程的实施，包括进行细胞实验、流式细胞术实验，荧光定量 PCR 实验，调查对象的选取、样本的采集等；李杨负责数据收集、采集、清洗和统计学分析等。

本文无利益冲突。

参考文献

[1] RAJKUMAR S V, KUMAR S, LONIAL S, et al. Smoldering multiple myeloma current treatment algorithms [J]. Blood Cancer J, 2022, 12: 129. DOI: 10.1038/s41408-022-00719-0.

[2] RAVI G, COSTA L J. Bispecific T-cell engagers for treatment of multiple myeloma [J]. Am J Hematol, 2023, 98 (Suppl 2): S13-21. DOI: 10.1002/ajh.26628.

[3] BRADY R V, THAMM D H. Tumor-associated macrophages: prognostic and therapeutic targets for cancer in humans and dogs [J]. Front Immunol, 2023, 14: 1176807. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1176807.

[4] TRUXOVA I, CIBULA D, SPISEK R, et al. Targeting tumor-associated macrophages for successful immunotherapy of ovarian carcinoma [J]. J Immunother Cancer, 2023, 11 (2): e005968. DOI: 10.1136/jitc-2022-005968.

[5] JIANG H F, LI H P. Prognostic values of tumoral MMP2 and MMP9 overexpression in breast cancer: a systematic review and meta-analysis [J]. BMC Cancer, 2021, 21 (1): 149. DOI: 10.1186/s12885-021-07860-2.

[6] CHENG Z Y, ZHANG X J, ZHANG Y, et al. Role of MMP-2 and CD147 in kidney fibrosis [J]. Open Life Sci, 2022, 17 (1): 1182-1190. DOI: 10.1515/biol-2022-0482.

[7] HASHEMI M, ETEMAD S, REZAEI S, et al. Progress in targeting PTEN/PI3K/Akt axis in glioblastoma therapy: Revisiting molecular interactions [J]. Biomedecine Pharmacother, 2023, 158: 114204. DOI: 10.1016/j.biopha.2022.114204.

[8] MOORE A R. Diagnosing multiple myeloma and related disorders [J]. Vet Clin North Am Small Anim Pract, 2023, 53 (1): 101-120. DOI: 10.1016/j.cvsm.2022.07.009.

[9] 段嘉宇，崔健，唐文娇，等. 多发性骨髓瘤疾病全周期健康管理[J]. 中国医学科学院学报，2022，44（4）：673-677. DOI：10.3881/j.issn.1000-503X.13467.

[10] MOREAU P, GARFALL A L, VAN DE DONK N W C J, et al. Teclistamab in relapsed or refractory multiple myeloma [J]. N Engl J Med, 2022, 387 (6): 495-505. DOI: 10.1056/nejmoa2203478.

[11] BLADÉ J, BEKSAC M, CAERS J, et al. Extramedullary disease in multiple myeloma: a systematic literature review [J]. Blood Cancer J, 2022, 12 (3): 45. DOI: 10.1038/s41408-022-00643-3.

[12] PAUL B, LIEDTKE M, KHOURI J, et al. A phase II multi-arm study of magrolimab combinations in patients with relapsed/refractory multiple myeloma [J]. Future Oncol, 2023, 19 (1): 7-17. DOI: 10.2217/fon-2022-0975.

[13] JASI SKI M, BILI SKI J, BASAK G W. The role of the crosstalk between gut microbiota and immune cells in the pathogenesis and treatment of multiple myeloma [J]. Front Immunol, 2022, 13: 853540. DOI: 10.3389/fimmu.2022.853540.

[14] SUN J, PARK C, GUENTHNER N, et al. Tumor-associated macrophages in multiple myeloma: advances in biology and therapy [J]. J Immunother Cancer, 2022, 10 (4): e003975. DOI: 10.1136/jitc-2021-003975.

[15] WANG S S Y, CHNG W J, LIU H Y, et al. Tumor-associated macrophages and related myelomonocytic cells in the tumor microenvironment of multiple myeloma [J]. Cancers, 2022, 14 (22): 5654. DOI: 10.3390/cancers14225654.

[16] KUMARI N, CHOI S H. Tumor-associated macrophages in cancer: recent advancements in cancer nanoimmunotherapies [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2022, 41 (1): 68. DOI: 10.1186/s13046-022-02272-x.

[17] ARVANITAKIS K, KOLETSA T, MITROULIS I, et al. Tumor-associated macrophages in hepatocellular carcinoma pathogenesis, prognosis and therapy [J]. Cancers: Basel, 2022, 14 (1): 226. DOI: 10.3390/cancers14010226.

[18] SALTARELLA I, ALTAMURA C, CAMPANALE C, et al. Anti-angiogenic activity of drugs in multiple myeloma [J]. Cancers: Basel, 2023, 15 (7): 1990. DOI: 10.3390/cancers15071990.

[19] XU Z J, CHEN Y, MA L, et al. Role of exosomal non-coding RNAs from tumor cells and tumor-associated macrophages in the tumor microenvironment [J]. Mol Ther, 2022, 30 (10): 3133-3154. DOI: 10.1016/j.ymthe.2022.01.046.

[20] LI Y T, CHEN Z M, HAN J H, et al. Functional and therapeutic significance of tumor-associated macrophages in colorectal cancer [J]. Front Oncol, 2022, 12: 781233. DOI: 10.3389/fonc.2022.781233.

[21] ACOSTA-MARTINEZ M, CABAIL M Z. The PI3K/akt pathway in meta-inflammation [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23 (23): 15330. DOI: 10.3390/ijms232315330.

[22] JIA S N, HAN Y B, YANG R, et al. Chemokines in colon cancer progression [J]. Semin Cancer Biol, 2022, 86 (pt 3): 400-407. DOI: 10.1016/j.semcancer.2022.02.007.

[23] CHERUKU S, RAO V, PANDEY R, et al. Tumor-associated macrophages employ immunoediting mechanisms in colorectal tumor progression: current research in Macrophage repolarization immunotherapy [J]. Int Immunopharmacol, 2023, 116: 109569. DOI: 10.1016/j.intimp.2022.109569.

[24] ANAGNOSTAKIS F, PIPERI C. Targeting options of tumor-associated macrophages (TAM) activity in gliomas [J]. Curr Neuropharmacol, 2023, 21 (3): 457-470. DOI: 10.2174/1570159X20666220120120203.

[25] VAGO J P, AMARAL F A, VAN DE LOO F A J. Resolving inflammation by TAM receptor activation [J]. Pharmacol Ther, 2021, 227: 107893. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2021.107893.

[26] DING J L, WANG J, CAI X P, et al. Granulocyte colony-stimulating factor in reproductive-related disease: function, regulation and therapeutic effect [J]. Biomed Pharmacother, 2022, 150: 112903. DOI: 10.1016/j.biopha.2022.112903.

[27] JOHN L, KRAUTH M T, PODAR K, et al. Pathway-directed therapy in multiple myeloma [J]. Cancers, 2021, 13 (7): 1668. DOI: 10.3390/cancers13071668.

（收稿日期：2023-05-29；修回日期：2023-07-03）

（本文编辑：康艳辉）